ZKBS
Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit

Az. 08020204.0003.0053 November 2026

Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von DAP-auxotrophen, rekombinanten *Escherichia coli* K12-Stämmen mit *inv*- und *hlyA*-Gen gemäß § 5 Abs. 1 GenTSV

Allgemeines

Als Alternative zu chemischen, mechanischen oder viralen Plattformen zum Gentransfer in eukaryote Zellen wurde eine bakterielle Gentransferplattform entwickelt, die auf rekombinanten, invasiven *Escherichia coli* K12-Stämmen aufbaut [1]. Diese bakterielle Plattform ermöglicht es, DNA, RNAi und andere Makromoleküle aktiv in eukaryote Zellen einzuführen [2]. Die Plattform basiert auf apathogenen *E. coli* K12-Derivaten mit Auxotrophie für 2,6-Diaminopimelinsäure (DAP) und Insertion der Gene *inv* aus *Yersinia pseudotuberculosis* und *hlyA* aus *Listeria monocytogenes* [2, 3]. Die Gene können dabei auf Plasmiden kodiert oder im Chromosom integriert vorliegen.

E. coli K12 und davon abgeleiteten Stämmen fehlen die meisten Virulenzfaktor-kodierenden Gene, welche in pathogenen *E. coli*-Isolaten meist in Form von Pathogenitätsinseln im Genom vorliegen [4, 5]. Daher sind diese Stämme apathogen und nicht in der Lage, sich im Körper von Säugern zu etablieren [4, 6]. Deswegen, und weil sie nicht in der Lage sind, sich außerhalb gentechnischer Anlagen zu vermehren sowie nur ein geringes Potential zum horizontalen Gentransfer besitzen, sind die Stämme durch die ZKBS als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme anerkannt [7].

Das *inv*-Gen aus *Yersinia pseudotuberculosis* kodiert für das Protein Invasin, ein membrangebundenes Protein der äußeren Membran, welches für die Bindung an β1-Integrinrezeptoren verantwortlich ist [8]. Die Präsentation von Invasin auf Oberflächen von Bakterien ist ausreichend, um nach Bindung an Rezeptoren eukaryoter Zellen, eine phagozytische Aufnahme zu initiieren [9]. *E. coli* K12-Stämme mit Invasin in der äußeren Membran werden innerhalb von zwei Stunden durch Säugerzellen phagozytiert [1].

Für Gram-negative und einige Gram-positive Bakterien ist DAP essentiell für die Synthese der Zellwand. *E. coli*-Bakterien können DAP entweder selbst synthetisieren oder über das Recycling von Peptidoglykanfragmenten aufnehmen [10]. DAP-auxotrophe *E. coli* K12-Stämme sind jedoch nicht in der Lage, sich in DAP-freien Nährmedien zu vermehren [11, 12]. Da die Stämme ohne DAP-Zufuhr die Integrität der Zellwand nicht aufrechterhalten können, lysieren die Zellen in DAP-freien Medien nach kurzer Zeit [11, 12]. Der Stoffwechsel von Säugern ist nicht zur Bildung von DAP befähigt. Infolgedessen wird freies DAP lediglich durch mikrobielle Abbauprozesse gebildet, u. a. in Folge von Immunprozessen, und in geringen Konzentrationen

über die Niere in den Urin ausgeschieden [13, 14]. Aufgrund des DAP-Mangels lysieren rekombinante *E. coli* K12-Stämme in kurzer Zeit im Phagosom. Nach spätestens 72 Stunden sind keine phagozytierten Bakterienzellen mehr in Säugerzelllinien nachweisbar [1].

Nach der Lyse der rekombinanten *E. coli* K12-Stämme kommt es zur Freisetzung von Listeriolysin O, welches durch das *hlyA*-Gen kodiert wurde. Listeriolysin O ist ein porenformendes Toxin, dessen Proteinstruktur bei pH-Werten unter 6 spontan denaturiert [15]. Die denaturierten Monomere oligomerisieren an der Lipidmembran des Phagosoms und bilden große Porenkomplexe. In Folge dessen kann zusätzliches Cargo des rekombinanten Stammes (RNAi, DNA, Proteine) in das Zytosol der infizierten Säugerzelle gelangen.

Das pathogene Potential dieser rekombinanten *E. coli* K12-Stämme wurde in einer *Peer review*-begutachteten Publikation sowie im Rahmen von nicht begutachteten präklinischen und klinischen Studien, deren Ergebnisse bisher nur auf wissenschaftlichen Kongressen vorgestellt wurden, untersucht. Nach Injektion von 1×10^8 oder 1×10^9 koloniebildenden Einheiten (KBE) in verschiedene Gewebe von BALB/c-Mäusen verblieben die rekombinanten *E. coli* K12-Stämme nach einem Testzeitraum von 18 Stunden im jeweiligen Gewebe [16]. Nach sechs intranasalen Applikationen von 1×10^8 KBE im Abstand von zwölf Stunden zeigten infizierte BALB/c-Mäuse weder Krankheitssymptome oder Veränderungen im Fress- und Sozialverhalten noch Gewichtsverluste [16]. Aus den nicht begutachteten Ergebnissen einer präklinischen Untersuchung geht hervor, dass Javaneraffen bei einer täglichen oralen Dosis von 4×10^{10} KBE über 28 Tage keine Krankheitssymptome aufwiesen [17]. In der nicht begutachteten Phase-I-Studie wurde je drei Probanden täglich über 28 Tage eine orale Dosis von 1×10^8 oder 1×10^9 KBE verabreicht [18]. Alle sechs Probanden vertrugen die orale Gabe ohne Nebenwirkungen und ohne klinische Veränderungen der Darmschleimhäute.

Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien in Anlage 1 GenTSV werden DAP-auxotrophe, rekombinante *Escherichia coli* K12-Stämme mit *inv*- und *hlyA*-Gen als gentechnisch veränderte Organismen der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

Begründung

Die oben beschriebenen rekombinanten *E. coli* K12-Stämme sind für den Menschen, Tiere und Pflanzen apathogen. Durch die Expression des Invasins sind die Zellen zwar in der Lage, Säugerzellen intrazellulär zu infizieren, jedoch sind die Bakterien aufgrund der DAP-Auxotrophie nicht intrazellulär vermehrungsfähig und lysieren innerhalb kurzer Zeit. Das nach der Phagozytose und anschließender Lyse der Bakterien freigesetzte Listeriolysin O führt zwar zur Bildung von Poren im Phagosom, ist für die Zelle aber nicht toxisch, da das Listeriolysin aufgrund eines ungeeigneten pH-Werts im Zytosol nicht oligomerisieren kann. Die Pathogenität von *E. coli* K12 wird nicht gesteigert.

Literatur

1. **Grillot-Courvalin C, Goussard S, Huetz F, Ojcius DM, Courvalin P** (1998). Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells. *Nat Biotechnol* **16**(9):862–6.

2. **Gulig P, Swindle S, Fields M, Eisenman D** (2024). A Review of Clinical Trials Involving Genetically Modified Bacteria, Bacteriophages and Their Associated Risk Assessments. *Appl Biosaf* **29**(4):186–206.
3. **Williams AB, Groseclose TM, Holec SAM, Newman D, Mora DSO, Linke L** (2026). Genetic principles enabling the creation of bacteria-based therapeutics. *Genetics*:1–18.
4. **Mühldorfer I, Hacker J** (1994). Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microb Pathog* **16**(3):171–81.
5. **van Ijperen C, Kuhnert P, Frey J, Clewley JP** (2002). Virulence typing of *Escherichia coli* using microarrays. *Mol Cell Probes* **16**(5):371–8.
6. **Chart H, Smith HR, La Ragione RM, Woodward MJ** (2000). An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5α and EQ1. *J Appl Microbiol* **89**(6):1048–58.
7. **ZKBS** (2021). Stellungnahme der ZKBS zur Eignung von *Escherichia coli* K12-abgeleiteten Stämmen als Teil biologischer Sicherheitsmaßnahmen gemäß § 8 Absatz 1 GenTS. Az. 45270_a April 2021. https://zkbs-online.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Stellungnahmen/Sicherheitsma%C3%9Fnahmen/Biologische_Sicherheitsma%C3%9Fnahmen/E._coli_K12-St%C3%A4mme_Eignung_als_biol._Sicherheitsma%C3%9Fnahme_2021.pdf. Geprüft am 23.10.2026.
8. **Simonet M, Falkow S** (1992). Invasin expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun* **60**(10):4414–7.
9. **Dersch P, Isberg RR** (1999). A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association. *EMBO J* **18**(5):1199–213.
10. **Simpson BW, Gilmore MC, McLean AB, Cava F, Trent MS** (2023). Escherichia coli utilizes multiple peptidoglycan recycling permeases with distinct strategies of recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **120**(44):e2308940120.
11. **Allard N, Garneau D, Poulin-Laprade D, Burrus V, Brzezinski R, Roy S** (2015). A diaminopimelic acid auxotrophic *Escherichia coli* donor provides improved counterselection following intergeneric conjugation with actinomycetes. *Can J Microbiol* **61**(8):565–74.
12. **Rhuland LE** (1957). Role of alpha, epsilon-diaminopimelic acid in the cellular integrity of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **73**(6):778–83.
13. **Born TL, Blanchard JS** (1999). Structure/function studies on enzymes in the diaminopimelate pathway of bacterial cell wall biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* **3**(5):607–13.
14. **Borruat G, Roten CA, Fay LB, Karamata D** (2001). A high-performance liquid chromatography method for the detection of diaminopimelic acid in urine. *Anal Biochem* **291**(1):11–6.
15. **Schuerch DW, Wilson-Kubalek EM, Tweten RK** (2005). Molecular basis of listeriolysin O pH dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(35):12537–42.
16. **Mora DSO, Cox M, Magunda F, Williams AB, Linke L** (2023). An optimized live bacterial delivery vehicle safely and efficaciously delivers bacterially transcribed therapeutic nucleic acids. *Eng Life Sci* **23**(3):1-15.
17. **D'Cruz O, Hwang L, Fong A, Ng K, Nam D, Wang W, Trieu V** (2017). Preclinical and Clinical Studies on Safety of CEQ508 Bacteria Engineered to Deliver Short-Hairpin RNA to Mediate RNA Interference Against β-catenin in the GI Tract of Patients With Familial Adenomatous Polyposis, Posterpräsentation (297). World Congress of Gastroenterology at ACG 2017. 13. - 18. Oktober. Orlando, Florida
18. **Trieu V, Hwang L, Ng K, D'Cruz O, Qazi S, Fong A** (2017). First-in-human Phase I study of bacterial RNA interference therapeutic CEQ508 in patients with familial adenomatous polyposis (FAP), Posterpräsentation (515P). 42nd ESMO Congress. 8. - 12. September. Madrid, Spanien